

Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ¹, Н. Э. КОЛЧАНОВА²

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ПРОТОЧНЫЙ БИОРЕАКТОР ДЛЯ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПОЛОСТИ РТА *IN VITRO*

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Создание условий *in vitro*, которые имитировали бы физиологические параметры органов и систем организма, является важной задачей для решения вопроса о тестировании новых материалов, антибактериальных препаратов и антисептических растворов в условиях лаборатории. Разработан автоматический проточный биореактор для одномоментного тестирования четырех стоматологических образцов. Биопленка, сформированная на поверхности тканей зуба в условиях перфузируемой термостатируемой ячейки, отличается меньшей толщиной, чем сформированная в статических условиях.

Ключевые слова: биопленка, автоматический проточный биореактор, эмаль зуба, полость рта.

Введение. Микробиом полости рта состоит из более чем 1000 различных видов бактерий и по оценке ряда авторов насчитывает около 20 миллиардов представителей. Для систематизации бактерий ротовой полости человека была создана Human Oral Microbiome Database (HOMD), которая включает как представителей нормальной микрофлоры, так и возбудителей заболеваний ротовой полости человека [1]. В настоящий момент HOMD включает свыше 774 видов микроорганизмов, принадлежащих к 16 типам: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gracilibacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SR1*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *TM7* и *WPS-2*. Приблизительно 58 % из них описаны и имеют видовое имя, 16 % – культивируются, но не описаны, 26 % – не культивируются [1, 2, 3]. С появлением современных молекулярно-генетических методов исследования, таких как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени и секвенирование, появились многочисленные данные по изучению протеома и метогенома ротовой жидкости. Согласно исследованию Cong Shic с соавторами в смешанной слюне было выделено 5 преобладающих типов микроорганизмов: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* [4]. В группе пациентов с активным кариесом были идентифицированы *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Oribacterium*, *Megasphaera* и *Kingella*; для группы с периодонтитом были характерны *Bifidobacterium*, *Porphyromonas* и *Peptostreptococcus*; в третьей группе с коморбидной патологией чаще встречались *Scardovia*, *Bacteroides*, *Selenomonas*, *Parvimonas*, *Lautropia*, *Campylobacter*, *Treponema*, *TG5* и *Candidatus Tammella*; в группе здоровых лиц преобладали *Prevotella*, *Neisseria* и *Haemophilus*. Таким образом, микробиом слюны отличается при различных патологических состояниях полости рта, он индивидуален, зависит от состава ротовой жидкости, например, уровня иммуноглобулинов, антибактериальных ферментов, биологически активных веществ. В смешанной слюне микроорганизмы находятся в виде ассоциаций, которые формируются после диссоциации биопленки [5]. Нарушения состава и функционирования микробиома смешанной слюны приводит к возникновению и развитию различных заболеваний, включая кариес, периодонтиты, а также соматические заболевания, такие как инфекционный эндокардит, иные заболевания сердечно-сосудистой системы, инсульт, диабет, пневмония [6, 7].

Слюна является одной из шести биологических жидкостей организма и играет жизненно важную роль в сохранении гомеостаза полости рта. В покое отражается базовая скорость слюноотделения [8]. Такая слюна присутствует во рту около 14 часов в сутки, стимулированная слюна – до 1,5 часов в сутки (она связана с алиментарными функциями). В сутки у человека вырабатывается в среднем от 1–2,5 л слюны, во рту в среднем находится от 1 до 2 мл. Норма выделения слюны составляет 2 мл за 10 минут. Скорость секреции неравномерна, она зависит от ряда факторов: отделение слюны уменьшается при стрессе, испуге или обезвоживании, практически прекращается во время сна и наркоза, также с возрастом (слюноотделение замедляется после 55–60 лет); усиление выделения слюны происходит при действии обонятельных и вкусовых стимулов, а также вследствие механического раздражения крупными частицами пищи и при жевании [9]. Кроме того, во время сна слюны выделяется в 8–10 раз меньше, чем в период бодрствования – от 0,3 до 0,5 мл/мин, а при стимуляции скорость выделения составляет 2,0–2,5 мл/мин [10, 11]. Патология слюнных желез, тканей полости рта и других органов приводит к развитию ксеростомии либо гиперсаливации. Наиболее неблагоприятным для пациента является состояние сухости полости рта (ксеростомия), при это скорость секреции нестимулированной слюны ниже 0,1 мл/мин, а стимулированной ниже 0,7 мл/мин [12, 13]. Это состояние может привести к галитозу, изменению микробиома полости рта, кариесу и заболеваниям пародонта [14, 15].

В настоящее время для исследования свойств стоматологических материалов применяют каппы с фиксированными на них биологически активными материалами, однако ограниченное число добровольцев, дискомфорт в полости рта, возможные побочные реакции со стороны биоактивных материалов указывают на несостоятельность данного способа. Таким образом, актуальным является изготовление динамической системы *in vitro*, в которой будет возможно воспроизвести микробную колонизацию, биопленкообразование на поверхности материалов; определить их антибактериальные и антибиопленочные свойства.

Материалы и методы исследования. Проточные камеры прототипа биореактора были изготовлены с применением 3D-принтера CREALITY ENDER 3 PRO из полиэтилентерефталатгликоля (PETG). Окончательная модель автоматического проточного биореактора изготовлена из термостойкого биоинертного полимерного материала – политетрафторэтилена. Для подачи и сброса жидкости использовали дистанционно управляемые перистальтические насосы Runze Fluid, Intllab, Китай, и силиконовые трубки с внутренним диаметром 1 мм.

В качестве материала для исследования применяли продольные шлифы эмали интактных постоянных зубов, удаленных по ортодонтическим показаниям у пациентов в возрасте от 17 до 30 лет. Образцы зубов хранили в 0,9 % растворе хлорида натрия. Толщина шлифов, полученных путем распила коронки алмазным инструментом с водяным охлаждением – 2 мм. Окончательную обработку поверхности производили терапевтическими полировочными дисками убывающей абразивности.

Формирование биоплёнки на поверхности тканей зуба проводили с использованием референсного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Контролем служила биопленка, сформированная в статических условиях [16]. Для культивирования биопленки в динамических условиях в качестве питательной среды был выбран бульон Мюллера-Хинтон. Стартовая концентрация бактериальных клеток составляла 10^7 клеток/мл, время инкубации 48 часов при температуре 35 °C. В качестве кариесогенного субстрата была выбрана 1 % глюкоза.

Качественный учет результатов проводили с применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для этого использовали микроскоп Leica TCS SPE (Leica Microsystems, Германия) с программным обеспечением LAS AF. Шлифы зуба фиксировали на стекле, окраску препаратов проводили раствором DAPI 0,02 мкг/мл, измерение проводили в 10 точках на поверхности образцов. Цифровое изображение результатов сканирования обрабатывали программой ImageJ (NIH, США). Этапы обработки включали получение 8-

битного изображения в градациях серого цвета и выделение в изображении областей интереса, соответствующих поверхности тканей зуба, содержащих биопленку.

Количественное определение способности микроорганизмов к образованию биопленки было выполнено с помощью спектрофотометрического метода, основой которого является окраска полисахаридного матрикса раствором кристаллического фиолетового с последующим определением массы микробной биопленки. Для определения массы полученные значения оптической плотности ($E_{оп}$) переводили в вес микробной биопленки, образованной микроорганизмами, из расчета на одну лунку 96-луночного планшета, используя формулу (1):

$$X = 226,28 \times E_{оп}^{1,28}, \quad (1)$$

где: X – искомая масса биопленки в лунке,

$E_{оп}$ – оптическая плотность лунки.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета «Statistica».

Результаты и их обсуждение. На первом этапе методом 3D-печати создан прототип биореактора, который имитирует динамические условия слюноотделения в полости рта. Проточные камеры прототипа биореактора представлены на рисунке 1. В устройстве биореактора четыре независимые камеры, которые объединены в общий корпус. Благодаря расположению входных и выходных отверстий на разном уровне, в каждой из ячеек поддерживается постоянный объем жидкости, который составляет 5 мл и ограничен положением выходного отверстия. Подача и сброс жидкости в проточной камере осуществляется благодаря перистальтическим насосам. Система подающих и отводящих перистальтических насосов соединена с ячейками биореактора посредством силиконовых трубок. Чтобы создать экспериментальные условия, близкие к физиологическим, выбрана скорость потока жидкости 0,3 мл/мин, что соответствует естественному току слюны в период бодрствования. Таким образом, описанная модель биореактора создает условия, близкие к физиологическим *in vivo*, что имеет решающее значение для изучения поверхности стоматологических материалов, предназначенных для использования в полости рта.

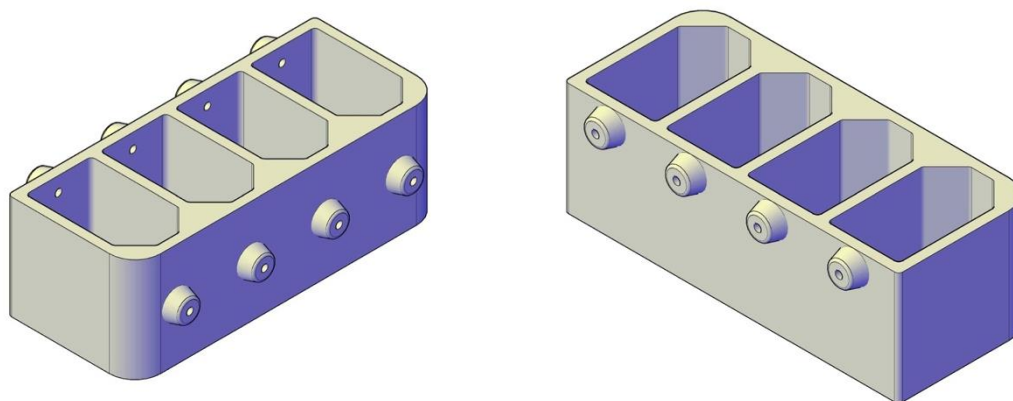


Рисунок 1. 3D модель прототипа биореактора

В дальнейшем была проведена оптимизация функциональных параметров и структуры системы, разработка и сбор автоматического проточного биореактора, моделирующего естественные условия ротовой полости, с использованием термостойкого биоинертного полимерного материала (политетрафторэтилена). Данная модель состоит из фторопластового корпуса, диаметром 60 мм и высотой 45 мм, который герметично закрывается фторопластовой крышкой. Внутри находятся четыре проточные камеры. Каждая из них имеет входное и выходное отверстия с интегрированными трубками из нержавеющей стали

для перфузии питательной среды и ее откачки. Емкость камеры определена положением выпускного отверстия и составляет 5 мл. Корпус устройства герметично закрывается фторопластовой крышкой с четырьмя газоотводными трубками, которые располагаются над каждой из камер (рисунок 2).

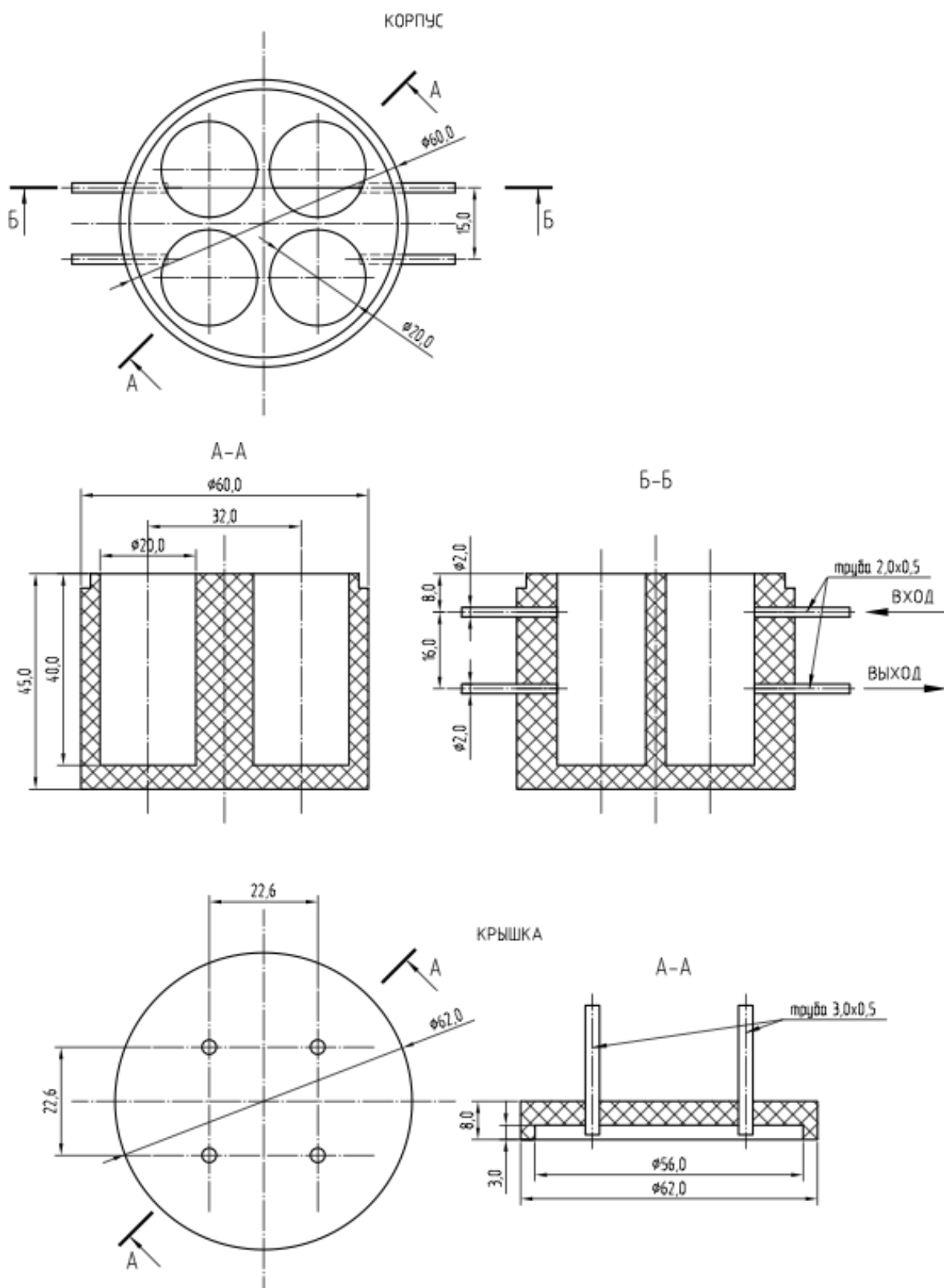


Рисунок 2. Автономный проточный биореактор для оценки антибактериальных свойств стоматологических материалов

Три перистальтических насоса соединяют герметично с трубками из нержавеющей стали подающих и отводящих отверстий силиконовыми шлангами, при этом первый насос осуществляет непрерывную подачу питательной среды в проточную камеру, второй насос обеспечивает непрерывный отвод избытка жидкости из камер, третий насос периодически осуществляет инфузию кариезогенного субстрата (раствора глюкозы) в камеры (рисунок 3).

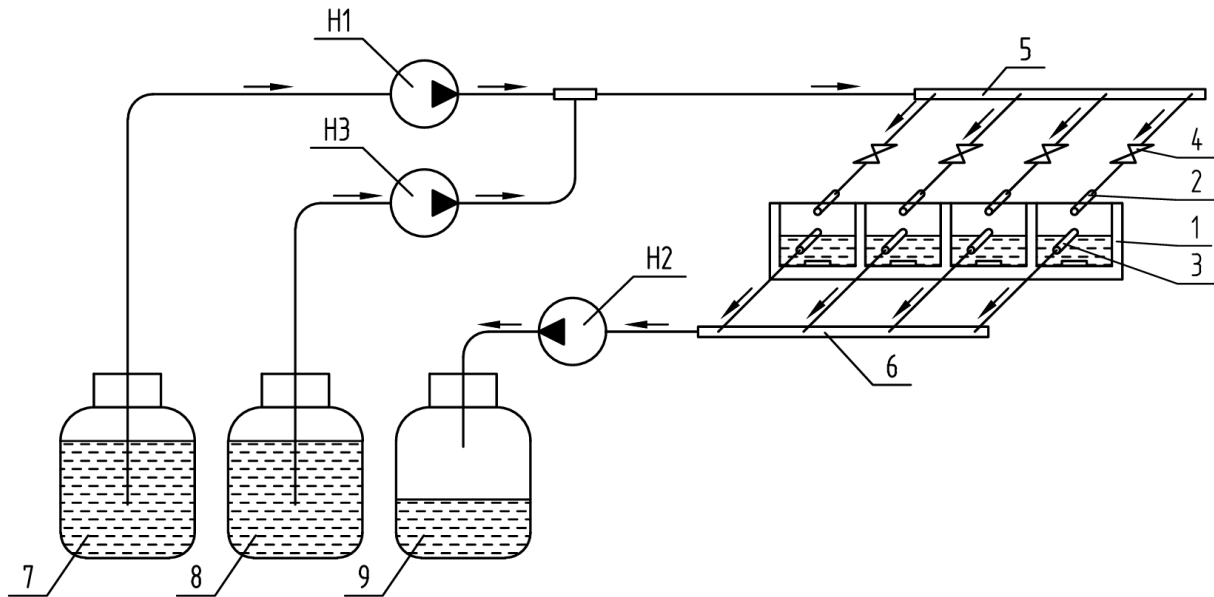


Рисунок 3. Схема автоматического проточного биореактора

1 – фторопластовый корпус; 2, 3 – интегрированные трубки из нержавеющей стали для перфузии питательной среды и ее откачки; 4 – шланговые шиберы; 5 – распределительный коллектор; 6 – собирающий коллектор; 7 – емкость со стерильной питательной средой; 8 – емкость с раствором глюкозы; 9 – емкость для сбора избытка жидкости; Н1 – насос для подачи питательной среды; Н2 – насос для откачки избытка жидкости; Н3 – насос для подачи раствора глюкозы

Система размещается в термостате при температуре 35 °С и работает автономно, насосы управляются дистанционно через WiFi-адаптеры.

С использованием проточного автоматического биореактора определены качественные и количественные характеристики формирования микробных биопленок на поверхности эмали зуба. В качестве контроля формировали биопленку в статических условиях на аналогичной поверхности. Согласно полученным данным, на поверхности тканей зуба в динамических условиях статистически значимо ($p < 0,05$) образуется более тонкая биопленка *S. aureus* толщиной $3,84 \pm 0,78$ мкм (рисунок 4). Полученная в статических условиях биопленка *S. aureus* обладает большей толщиной на поверхности эмали зуба и составляет $12,7 \pm 1,92$ мкм (рисунок 5). Анализ изображения в программе ImageJ показал, что статистически значимо ($p < 0,05$) большую интенсивность окраски имела биопленка *S. aureus*, сформированная в статических условиях (11,34) в сравнении с аналогичной биопленкой в динамической среде (3,28).

Количественный анализ биопленкообразования позволил установить, что в динамических условиях биореактора на поверхности тканей зуба образуется биопленка *S. aureus* массой $6,09 \pm 0,03$ мкг/лунку, что статистически значимо ($p < 0,001$) меньше, чем в статических условиях культивирования образцов. Полученная в статических условиях биопленка *S. aureus* составила $55,91 \pm 0,18$ мкг/лунку.

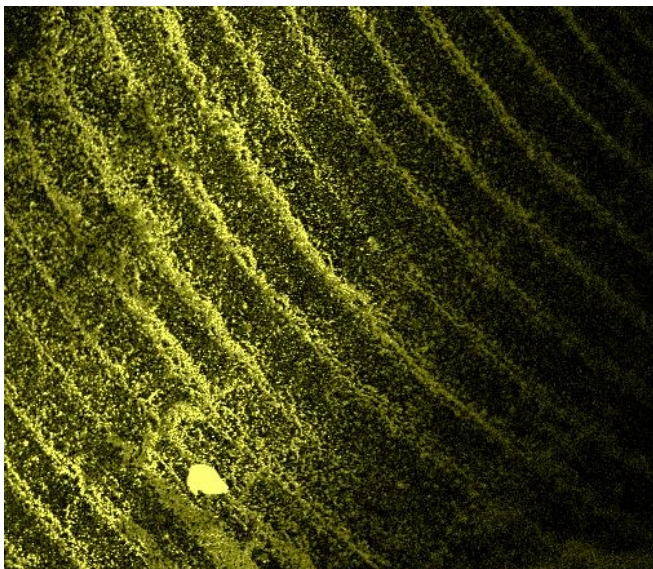


Рисунок 4. Биопленка *S. aureus* на поверхности эмали зуба в статических условиях

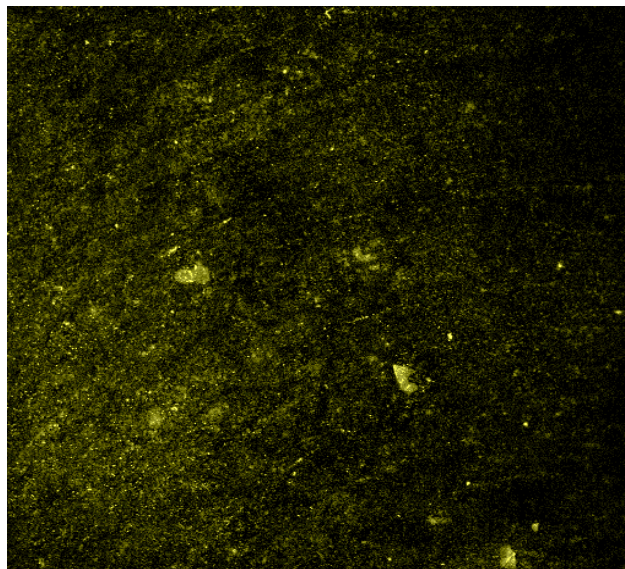


Рисунок 5. Биопленка *S. aureus* на поверхности эмали зуба в динамических условиях

За последние десятилетия были разработаны различные проточные системы для анализа формирования и роста бактериальных биопленок на различных поверхностях. Данные системы успешно конкурируют со статическими условиями культивирования микроорганизмов. В работе Henryke R. et al. описано устройство с проточной камерой для анализа роста микробной биопленки на поверхности дентальных имплантатов *in vitro* [17]. Также известно устройство для выращивания микробных биопленок на поверхности стоматологических материалов, размещаемых в перфузионной системе [18]. Приведенные примеры, а также разработанный нами изначальный прототип биореактора, созданный с использованием 3D-печати, имеют ряд недостатков, среди них термолабильность конструкции и невозможность термической стерилизации, пористость структуры проточных камер, сложность конструкции проточной ячейки, а также отсутствие систем для равномерного распределения питательной среды и кариесогенных субстратов, отсутствие элиминации продуктов метаболизма микроорганизмов.

Заключение. Предложенная модель автоматического проточного биореактора за счет постоянной перфузии культуральной жидкости, присутствия микроорганизмов, характерных для ротовой полости, болюсной подачи глюкозы на поверхности сразу нескольких исследуемых образцов позволяет проводить исследования в условиях, максимально приближенных к естественным. Анализ полученных данных подтверждает, что в условиях *in vivo* движение жидкостей организма оказывает существенное влияние на рост и развитие микроорганизмов, а также формирование ими биопленок. В динамических условиях биореактора отмечено уменьшение интенсивности образования микробной биопленки на поверхности эмали зуба.

Применение разработанного автоматического проточного биореактора позволяет использовать его в микробиологических лабораториях для проведения исследований, связанных с оценкой антимикробной активности новых стоматологических материалов, функционализированных поверхностей и композиционных покрытий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Литература:

- [1]. Chen T., Yu W.H., Izard J. et. al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information // Database (Oxford). 2010. Vol. 2010. P. 1–10.

- [2]. Zarco M.F., Vess T.J., Ginsburg G.S. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine // *Oral Dis.* 2012. Vol. 18. P. 109–120.
- [3]. Степанова Т.Ю., Тимофеева А.В. Микробиом ротовой полости человека // *Современные проблемы науки и образования.* 2016. № 5. С. 308.
- [4]. Shi C., Cai L., Xun Z. et. al. Metagenomic analysis of the salivary microbiota in patients with caries, periodontitis and comorbid diseases // *J Dent Sci.* 2021. Vol. 16. P. 1264–1273.
- [5]. Filoche S., Wong L., Sissons C.H. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology // *J. of Dental Research.* 2009. Vol. 89. P. 8–18.
- [6]. Mark Welch J.L., Rossetti B.J., Rieken C.W. et. al. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. Vol. 113. P. 791–800.
- [7]. Kilian M., Chapple I.L., Hannig M. et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals // *Br Dent J.* 2016. Vol. 221. P. 657–666.
- [8]. Лейс, П.А. Смешанная слюна (состав, свойства и функции). Мн.: Беларусь, 2004. 42 с.
- [9]. Gil-Montoya J.A., Sánchez-Lara I., Carnero-Pardo C. et al. Oral Hygiene in the Elderly with Different Degrees of Cognitive Impairment and Dementia // *J Am Geriatr Soc.* 2017. Vol. 65. P. 642–647.
- [10]. Song M., Bai H., Zhang P. et. al. Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics // *Int. J of Oral Science.* 2023. Vol. 15. P. 1–17.
- [11]. Pedersen A.M.L., Sørensen C.E., Proctor G.B. et. al. Salivary secretion in health and disease // *J Oral Rehabil.* 2018. Vol. 45. P. 730–746.
- [12]. López-Pintor R.M., Casañas E., González-Serrano J. et. al. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients // *J Diabetes Res.* 2016. Vol. 2016. P. 1-15.
- [13]. Hopcraft M.S., Tan C. Xerostomia: an update for clinicians // *Austr. Dent. J.* 2010. Vol. 55. P. 238–244.
- [14]. Ронь Г.И. Клинический опыт лечения инфекционно-воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта с использованием препарата на основе кремнийорганического глицерогидрогеля // *Уральский медицинский журнал.* 2008. Т. 50. № 10. С. 59–60.
- [15]. Cui Y., Mengying Y., Jia Z. et. al. Developments in diagnostic applications of saliva in human organ diseases // *Med in Novel Techn and Dev.* 2022. Vol. 13. P. 1–11.
- [16]. Окулич В.К., Колчанова Н.Э., Чернявский Ю.П. Особенности течения хронического периодонтита, ассоциированного с биопленкообразующими микроорганизмами // *Пародонтология.* 2018. Т. 23. № 4. С. 9–14.
- [17]. Henryke R., Sascha N.S., Meike S. Development of a flow chamber system for the reproducible in vitro analysis of biofilm formation on implant materials // *Plos One.* 2017. Vol. P. 1–12.
- [18]. Kohno T., Kitagawa H., Tsuboi R. et. al. Establishment of novel in vitro culture system with the ability to reproduce oral biofilm formation on dental materials // *Nature. Sc Reports.* 2021. Vol. 11. P. 1–18.

D. V. TAPALSKY¹, N. E. KOLCHANOVA²

AUTOMATIC FLOW BIOREACTOR FOR REPRODUCTION OF PHYSIOLOGICAL CONDITIONS OF THE ORAL CAVITY IN VITRO

¹ State Scientific Institution «Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

² Educational Institution «Gomel State Medical University», Gomel, Republic of Belarus

Summary

Creating *in vitro* conditions that mimic the physiological parameters of organs and systems is an important task to solve the question of testing new materials, antibacterial drugs and antiseptic solutions in laboratory conditions. Developed automatic flow bioreactor for one-time testing of four samples. The biofilm formed on the surface of dental tissues under the conditions of a perfused thermostatted cell is thinner than that formed under static conditions.

Keywords: biofilm, automatic flow bioreactor, tooth enamel, oral cavity.